

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :  C07K 13/00, A61K 39/095		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/07172  (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00904  (22) Date de dépôt international: 29 septembre 1992 (29.09.92)		(74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, boulevard des Batignolles, F-75008 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 91/12176 3 octobre 1991 (03.10.91) FR		(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE).	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).  (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). LISSOLO, Ling [FR/FR]; 691, rue du Vallon, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	

(54) Title: SUBUNIT VACCINE FOR *NEISSERIA MENINGITIDIS* INFECTIONS AND CORRESPONDING PURIFIED SUBUNITS

(54) Titre: VACCIN DE SOUS-UNITE CONTRE LES INFECTIONS A *NEISSERIA MENINGITIDIS* ET SOUS-UNITES CORRESPONDANTES A L'ETAT PURIFIE

(57) Abstract

A purified lower molecular weight subunit of the human transferrin receptor of an *N. meningitidis* strain, and a pharmaceutical vaccine composition containing said purified subunit for preventing or controlling the effects of an *N. meningitidis* infection.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée ainsi qu'une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention ou à l'atténuation des effets d'une infection à *N. meningitidis* qui contient ladite sous-unité sous forme purifiée.

Best Available Copy

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Lichtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TC	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

5

**Vaccin de sous-unité contre les infections à *Neisseria meningitidis*  
et sous-unités correspondantes à l'état purifié**

10

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention des méningites causées par *Neisseria meningitidis*.

15

D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

20

L'espèce *N. meningitidis* est sub-divisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

25

Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

30

Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparaît hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du sérogroupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

5 D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir des protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la  
10 lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligeable chez l'homme (de l'ordre de :  $10^{-18}$  M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

15 Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

20 Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kD, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en  
25 présence de SDS.

30 Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est appelé, par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant, des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

35 De manière surprenante, on a maintenant trouvé que la sous-unité de haut poids moléculaire ne pourrait pas induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction.

En conséquence, l'invention propose :

- 5        i)      La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité, sous forme purifiée ; c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur ; et
- 10      ii)     Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur ;
- 15      iii)    L'usage thérapeutique de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur ; et
- 20      iv)    Une méthode de vaccination à l'encontre des infections à *N. meningitidis*, qui comprend l'acte d'administrer une quantité efficace d'un point de vue thérapeutique de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité, en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement.

D'une manière générale, la sous-unité de moindre poids moléculaire peut être obtenue sous forme purifiée (c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire) notamment à partir d'un récepteur de la transferrine. Ce dernier peut être isolé à partir d'une souche de *N. meningitidis* préalablement cultivée dans un milieu carencé en fer sous forme libre notamment selon la méthode de Schryvers et al, WO 90/12591, décrite de manière similaire dans Schryvers et al, Infect. Immun. (1988) 56 (5) : 1144. Puis le récepteur purifié est soumis à l'action d'un agent fortement dénaturant tel que l'urée 8M ou la guanidine HCl 6M. Les sous-unités dissociées sont finalement séparées par des méthodes chromatographiques classiques telles

qu'une chromatographie d'échange d'ions, une chromatographie hydrophobe ou de gel de filtration.

De manière alternative, la sous-unité de moindre poids moléculaire peut être produite en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique. Le fragment d'ADN codant pour cette sous-unité peut être exprimé dans un système d'expression hétérologue (e.g. bactérie, levure, cellule de mammifère). La sous-unité est dans ce cas-là recueillie à partir d'une culture et purifiée. Ces méthodes sont en outre parfaitement adaptées à la production des fragments ou des analogues de la sous-unité.

Par "fragment de la sous-unité de moindre poids moléculaire", on signifie un peptide ayant une séquence d'acides aminés qui est incluse dans la séquence de la sous-unité. Par "anologue de la sous-unité de moindre poids moléculaire", on signifie une protéine ayant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 95 % avec la séquence de la sous-unité. Aux fins de la présente invention, il est bien entendu qu'un tel fragment ou un tel analogue doit conserver les propriétés immunogènes de la sous-unité.

20

Par rapport à la sous-unité Tbp2, les souches de *N.meningitidis* peuvent se répartir en 2 grands groupes :

- celles dont la sous-unité Tbp2 a un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ (souches dites de type 2394) ; et
- celles dont la sous-unité Tbp2 a un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ (souches dites de type 2169).

30

D'une manière générale, la sous-unité de moindre poids moléculaire utile aux fins de la présente invention peut avoir pour origine une souche de *N. meningitidis* de n'importe quel sérogroupe. De manière avantageuse, elle a pour origine une souche de *N. meningitidis* sérogroupe B. Selon un aspect de l'invention tout à fait préféré, elle a pour origine la souche de *N. meningitidis* B16B6, aussi appelée 2394 (B:2a:P1.2:L2.3) ou M982 aussi appelée 2169 (B:9:P1.9:L3.7) qui sont publiquement disponibles auprès de la Collection de

l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs CIP 7908 et CIP 7917.

5 A titre d'exemple, la sous-unité Tbp2 des souches 2394 et 2169 est décrite par référence à sa séquence d'acides aminés telle que montrée dans les identificateurs de séquences n°1 et 2 (SEQ ID N°1 et 2). Les poids moléculaires apparents de ces sous-unités sont respectivement 68-70 et 87 kD environ, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

10 Une composition pharmaceutique selon l'invention est notamment utile pour prévenir ou atténuer les effets d'une infection à *N. meningitidis*.

15 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe l'agent thérapeutique selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intra-musculaire ou par voie intraveineuse, par exemple sous forme de suspension injectable. L'administration 20 peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

25 Enfin une composition selon l'invention peut contenir une ou plusieurs sous-unités de moindre poids moléculaire selon qu'elles proviennent de différentes souches de *N. meningitidis*. Ainsi, selon un aspect particulier de l'invention, une composition pharmaceutique avantageuse comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de type 2394 (poids moléculaire de 65 à 74 kD) et la sous-unité de 30 moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de type 2169 (poids moléculaire de 75 à 90 kD).

35 De manière préférée, une composition selon l'invention comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche 2394 (poids moléculaire : 68-70 kD) et la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche 2169 (poids moléculaire : 87 kD).

L'invention est décrite en détails dans les exemples ci-après.

5           **EXEMPLE 1 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2394, par chromatographie d'échanges d'ions.

#### 1A - Culture

10           Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* 2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Mueller-Hinton contenant du sang cuit (5 %).

15           Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO<sub>2</sub>, la nappe bactérienne est recueillie pourensemencer 150 ml de BMH pH 7,2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémentés avec 30 µm d'ethylenediamine-di (o-hydroxyphenylacetic acid) (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer 20 sous forme libre.

25           Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

#### 1B - Purification

30           La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

35           Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8,0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat

cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg.

5       Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

10      A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotinylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé pendant 60 min à température ambiante.

15      Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine, Sigma) à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM respectivement. Après une incubation de 15 min à 37°C sous agitation, on ajoute 1 ml de résine streptavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en 20 tampon A. La suspension est incubée 15 min à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

25      La résine est lavée par 3 volumes de colonne de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon Tris-HCl 50mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,05 % et de la guanidine HCl 2M. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à 30 1 Vol., dans des tubes contenant 1 Vol. de Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

35      Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8,0 contenant de l'urée 0,5 M, puis concentrées sur une cellule de concentration de type Amicon équipée de

membrane dont le seuil de coupure est de 10 000 Daltons à la concentration finale d'environ 3 mg de protéine/ml.

5 Une certaine quantité d'urée est ajoutée à la solution concentrée de façon que la concentration finale en urée soit de 8M, la concentration finale de la solution protéique restant comprise entre 2 à 3 mg/ml. La solution est incubée pendant 6 jours à 4°C.

10 Le mélange est ensuite chromatographié sur une résine échangeuse d'anions (Q-Sépharose Pharmacia) préalablement équilibrée dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant de l'urée 5M.

15 Dans ces conditions, la sous-unité de haut-poids moléculaire (Tbp1) est directement recueillie dans l'éluat direct tandis que la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est élue par un gradient linéaire de 0 - 1 M NaCl dans le tampon A contenant du Sarkosyl 0,5 % et l'urée 5M. La densité optique à 280 nm est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

20 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

25 Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à - 70°C.

30 **EXAMPLE 2 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine, à partir de la souche 2169.

35 La culture de la souche 2169 et la purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

**EXEMPLE 3 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine à partir de la souche *N. meningitidis* 2394 par chromatographie hydrophobe.

5 La culture de la souche *N. meningitidis* 2394, ainsi que les étapes de purification allant jusqu'à la préparation de la suspension membranaire sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

10 A un volume de la suspension de membranes, on ajoute un volume identique de Tris-HCl 50mM pH 8,0 contenant NaCl 2M, EDTA 20 mM, Sarkosyl 1 % (p/v). Le mélange est incubé 15 min à 37°C sous agitation douce. Puis un volume de cette suspension est mis en contact avec un volume identique de résine Sépharose 4B couplée à la transferrine humaine. Cette résine d'affinité a été couplée en greffant de la transferrine humaine (Sigma, St Louis 15 USA) à du Sépharose 4B-CNBr (Pharmacia) selon les recommandations du fabricant. La densité du ligand et de 5 mg transferrine/ml de résine. Le contact se fait en bain pendant 1 h à température ambiante sous agitation rotative douce. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne, l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 NaCl 1M EDTA 10mM Sarkosyl 0,05 % et guanidine HCl 2M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV. Les fractions correspondant au pic d'élution sont réunies et la protéine est précipitée par addition de trois volumes d'éthanol refroidi.

30 Après une nuit d'incubation à + 4°C, la protéine est recueillie par centrifugation pendant une heure à 10.000 x g. Le précipité est repris par un certain volume de tampon phosphate 10 mM pH 7,0 contenant NaCl 0,5 M, guanidine-HCl 5 M (tampon D) de façon à ce que la concentration finale en protéine soit d'environ 1mg/ml. La solution est mise en contact avec la résine de phényl-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le même

tampon. L'incubation se fait en bain sous agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante. Le gel est ensuite conditionné dans une colonne.

5 Dans ces conditions, la sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) est recueillie dans l'éluat direct, tandis que la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) est fixée sur la résine. La colonne est rincée par trois volumes de tampon D puis par 5 volumes de tampon phosphate 10 mM pH 7,0. Tbp2 est éluée par le tampon phosphate 10mM pH 7,0 contenant 0,5 % de Sarkosyl. L'excès de Sarkosyl contenu dans le tampon d'élution de Tbp2 est 10 éliminé par précipitation à l'éthanol, la protéine est ensuite reprise dans le tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C).

15 La solution est ensuite filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm. Le contenu en protéine est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

20 **EXAMPLE 4 :** Purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire à partir de la souche *N. meningitidis* 2169 par chromatographie hydrophobe.

La culture de la souche *N. meningitidis* 2169 et la purification de la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine (Tbp2) sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'exemple 3.

25 **EXAMPLE 5 :** Mise en évidence de l'importance de la sous-unité de moindre poids moléculaire à titre d'agent vaccinal.

30 On évalue l'activité bactéricide de sérum spécifiquement dirigés contre la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tbp2) du récepteur de la transferrine des souches *N. meningitidis* 2394 et 2169.

Pour ce faire, les sous-unités Tbp2 ont été préparées par chromatographie hydrophobe, tel que décrit dans les exemples 3 et 4.

35 Des lapins néo-zélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 50µg de Tbp2 isolée de la souche 2394 ou 2169, en présence d'adjuvant complet de Freund (Difco). 21 et 42 jours après la première

injection, les lapins reçoivent à nouveau 50 µg de sous-unité Tbp2 purifiée, mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm.

5

Une gamme de dilution de chacun des antisérum anti-Tbp2 2394 et anti-Tbp2 2169 est préparée en milieu M199 (Gibco). 200 µl de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une macroplaqué de titrage (8x12in.). Un essai témoin est réalisé avec 200 µl de milieu M199. Dans chacun des puits on ajoute (i) 100 µl d'une culture en phase de croissance exponentielle d'une souche de *N. meningitidis*, en milieu Mueller-Hinton contenant à 30 µM EDDA et (ii) 100 µl de complément (sérum de jeune lapin dilué).

10

Après 30 min d'incubation à 37°C sous agitation douce, on ajoute dans chaque puits, 1ml de milieu Mueller-Hinton contenant 1ml d'agar noble en surfusion. Après solidification du milieu, l'incubation est poursuivie 18-24 hrs à 37°C ; puis le nombre d'unités formant des colonies dans chaque puits est évalué. L'inverse de la dernière dilution d'antisérum en présence de laquelle on observe 50 % de lyse par rapport au témoin, correspond au titre bactéricide.

15

20 Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Activité bactéricide des antisérum anti-Tbp2 2394 et anti-Tbp2 2169

Neisseria meningitidis		Activité bactéricide		
Souche	sérogroupe/type/sous type	Sérum anti-Tbp2 2394	préimmunisation	postimmunisation
2394	B, 2a, P1.2	< 8	512	-
2169	B, 9, P1.9	-	-	< 8
				128

L'antisérum est bactéricide vis-à-vis de la souche à partir de laquelle Tbp2 a été purifiée démontrant que les anticorps anti-Tbp2 induits sont fonctionnels et ont la capacité de lyser la bactérie en présence de complément.

5

EXEMPLE 6 : Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

10 La solution stérile obtenue dans l'Exemple 3 ou 4 est décongelée. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 200 µg/ml d'un principe actif, on mélange stérilement les solutions suivantes :

-	Solution contenant la sous-unité Tbp2 du récepteur 2394 (ou 2169) à 1 mg/ml dans du tampon C	200 ml
-	Eau physiologique tamponnée (PBS) à pH 6,0	300 ml
-	Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al <sup>+++</sup> /ml	50 ml
-	Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS	10 ml
-	PBS qsp	1000 ml

30 EXEMPLE 7 : Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

35 Les solutions stériles obtenues dans les Exemples 3 et 4 sont décongelées. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 100 µg/ml de chacun des principes actifs, on mélange stérilement les solutions suivantes :

-	Solution contenant la sous-unité Tbp2 du récepteur 2394 à 1mg/ml dans du tampon C	100 ml
---	---	--------

- Solution contenant la sous-unité Tbp2  
du récepteur 2169 à 1mg/ml  
dans du tampon C 100 ml
- 5 - Eau physiologique tamponnée (PBS)  
à pH 6,0 300 ml
- Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al<sup>+++</sup>/ml 50 ml
- 10 - Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS 10 ml
- PBS qsp 1000 ml

SEQ ID NO : 1

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 *N. meningitidis* 2394.

Cys Leu Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu Asp Ser Val Glu Thr  
1 5 10 15

Val Gln Asp Met His Ser Lys Pro Lys Tyr Glu Asp Glu Lys Ser  
20 25 30

Gln Pro Glu Ser Gln Gln Asp Val Ser Glu Asn Ser Gly Ala Ala  
35 40 45

Tyr Gly Phe Ala Val Lys Leu Pro Arg Arg Asn Ala His Phe Asn  
50 55 60

Pro Lys Tyr Lys Glu Lys His Lys Pro Leu Gly Ser Met Asp Trp  
65 70 75

Lys Lys Leu Gln Arg Gly Glu Pro Asn Ser Phe Ser Glu Arg Asp  
80 85 90

Glu Leu Glu Lys Lys Arg Gly Ser Ser Glu Leu Ile Glu Ser Lys  
95 100 105

Trp Glu Asp Gly Gln Ser Arg Val Val Gly Tyr Thr Asn Phe Thr  
110 115 120

Tyr Val Arg Ser Gly Tyr Val Tyr Leu Asn Lys Asn Asn Ile Asp  
125 130 135

Ile Lys Asn Asn Ile Val Leu Phe Gly Pro Asp Gly Tyr Leu Tyr  
140 145 150

Tyr Lys Gly Lys Glu Pro Ser Lys Glu Leu Pro Ser Glu Lys Ile  
155 160 165

Thr Tyr Lys Gly Thr Trp Asp Tyr Val Thr Asp Ala Met Glu Lys  
170 175 180

Gln Arg Phe Glu Gly Leu Gly Ser Ala Ala Gly Gly Asp Lys Ser  
185 190 195

Gly Ala Leu Ser Ala Leu Glu Glu Gly Val Leu Arg Asn Gln Ala  
200 205 210

Glu Ala Ser Ser Gly His Thr Asp Phe Gly Met Thr Ser Glu Phe  
215 220 225

Glu Val Asp Phe Ser Asp Lys Thr Ile Lys Gly Thr Leu Tyr Arg  
230 235 240

Asn Asn Arg Ile Thr Gln Asn Asn Ser Glu Asn Lys Gln Ile Lys  
245 250 255

Thr Thr Arg Tyr Thr Ile Gln Ala THr Leu His Gly Asn Arg Phe  
 260 265 270  
 Lys Gly Lys Ala Leu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Thr Asn Gly Ser  
 275 280 285  
 His Pro Phe Ile Ser Asp Ser Asp Ser Leu Glu Gly Gly Phe Tyr  
 290 295 300  
 Gly Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ala Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp  
 305 310 315  
 Asn Lys Val Ala Ala Val Phe Gly Ala Lys Gln Lys Asp Lys Lys  
 320 325 330  
 Asp Gly Glu Asn Ala Ala Gly Pro Ala Thr Glu Thr Val Ile Asp  
 335 340 345  
 Ala Tyr Arg Ile Thr Gly Glu Glu Phe Lys Lys Glu Gln Ile Asp  
 350 355 360  
 Ser Phe Gly Asp Val Lys Lys Leu Leu Val Asp Gly Val Glu Leu  
 365 370 375  
 Ser Leu Leu Pro Ser Glu Gly Asn Lys Ala Ala Phe Gln His Glu  
 380 385 390  
 Ile Glu Gln Asn Gly Val Lys Ala Thr Val Cys Cys Ser Asn Leu  
 395 400 405  
 Asp Tyr Met Ser Phe Gly Lys Leu Ser Lys Gku Asn Lys Asp Asp  
 410 415 420  
 Met Phe Leu Gln Gly Val Arg Thr Pro Val Ser Asp Val Ala Ala  
 425 430 435  
 Arg Thr Glu Ala Lys Tyr Arg Gly Thr Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr  
 440 445 450  
 Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Glu Ala Ser Asn Gln Glu  
 455 460 465  
 Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Asp Val Asp Phe Ser Thr Lys Lys  
 470 475 480  
 Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Asp Arg Thr Ser Pro Ala Phe  
 485 490 495  
 Thr Ile Thr Ala Met Ile Lys Asp Asn Gly Phe Ser Gly Val Ala  
 500 505 510  
 Lys Thr Gly Glu Asn Gly Phe Ala Leu Asp Pro Gln Asn Thr Gly  
 515 520 525  
 Asn Ser His Tyr Thr His Ile Glu Ala Thr Val Ser Gly Gly Phe  
 530 535 540  
 Tyr Gly Lys Asn Ala Ile Glu Met Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro  
 545 550 555  
 Gly Asn Ala Pro Glu Gly Lys Gln Glu Lys Ala Ser Val Val Phe  
 560 565 570  
 Gly Ala Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln  
 575

SEQ ID NO : 2

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* 2169.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	-						
1				5				10							
Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Pro	Arg	Pro	Ala	Pro	Lys	Tyr	Gln	
				15				20					25		
Asp	Val	Ser	Ser	Glu	Lys	Pro	Gln	Ala	Gln	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	
				30				35					40		
Tyr	Gly	Phe	Ala	Met	Arg	Leu	Lys	Arg	Arg	Asn	Trp	Tyr	Pro	Gly	
				45				50					55		
Ala	Glu	Glu	Ser	Glu	Val	Lys	Leu	Asn	Glu	Ser	Asp	Trp	Glu	Ala	
				60				65					70		
Thr	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys	Pro	Lys	Glu	Leu	Pro	Lys	Arg	Gln	Lys	
				75				80					85		
Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Val	Glu	Thr	Asp	Gly	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	
				90				95					100		
Ser	Ser	Pro	Tyr	Ile	Thr	Pro	Ser	Asn	His	Gln	Asn	Gly	Ser	Ala	
				105				110					115		
Gly	Asn	Gly	Val	Asn	Gln	Pro	Lys	Asn	Gln	Ala	Thr	Gly	His	Glu	
				120				125					130		
Asn	Phe	Gln	Tyr	Val	Tyr	Ser	Gly	Trp	Phe	Tyr	Lys	His	Ala	Ala	
				135				140					145		
Ser	Glu	Lys	Asp	Phe	Ser	Asn	Lys	Lys	Ile	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp	
				150				155					160		
Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	His	Gly	Glu	Lys	Pro	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro	
				165				170					175		
Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile	Tyr	Lys	Gly	Val	Trp	His	Phe	Val	Thr	
				180				185					190		
Asp	Thr	Lys	Lys	Gly	Gln	Asp	Phe	Arg	Glu	Ile	Ile	Gln	Pro	Ser	
				195				200					205		
Lys	Lys	Gln	Gly	Asp	Arg	Tyr	Ser	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser	
				210				215					220		
Glu	Glu	Tyr	Ser	Asn	Lys	Asn	Glu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asp	Asp	His	
				225				230					235		
Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	
				240				245					250		
Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Lys	Leu	Ile	Arg	Asn	Asn	Ala	Ser	Leu	Asn	
				255				260					265		

Asn Asn Thr Asn Asn Asp Lys His Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu  
270 275 280

Asp Ala Gln Ile Thr Gly Asn Arg Phe Asn Gly Thr Ala Thr Ala  
285 290 295

Thr Asp Lys Lys Glu Asn Glu Thr Lys Leu His Pro Phe Val Ser  
300 305 310

Asp Ser Ser Ser Leu Ser Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu  
315 320 325

Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val  
330 335 340

Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Asp Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala  
345 350 355

Ala Ser Gly Ser Thr Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly  
360 365 370

Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val  
375 380 385

Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe  
390 395 400

Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly Ile Met Ile Pro Leu  
405 410 415

Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Asn Thr Gln Ala Asp Lys Gly  
420 425 430

Lys Asn Gly Gly Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe Glu His Thr Pro  
435 440 445

Glu Ser Asp Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln Thr Asn Gly  
450 455 460

Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys Thr  
465 470 475

Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu  
480 485 490

Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln  
495 500 505

Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val  
510 515 520

Glu Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu  
525 530 535

Ile Pro Thr Asp Gln Asn Val Val Tyr Arg Gly Ser Trp Tyr Gly  
540 545 550

His Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Asn Ala Ser Asp Lys  
555 560 565

Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys  
570 575 580

Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr  
585 590 595

Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly Asn Gly Phe Glu Gly Thr  
600 605 610

Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Lys Asn Thr  
615 620 625

Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Lys Gly  
630 635 640

Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala  
645 650 655

Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr Ser Ser  
660 665 670

Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys  
675 680 685

Arg Gln Gln Pro Val Gln  
690

Revendications

1. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité, sous forme purifiée.
2. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée.
3. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* sérogroupe B, sous forme purifiée.
4. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ.
5. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de la souche de *N. meningitidis* 2394, sous forme purifiée.
6. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis*, sous forme purifiée ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ.
7. La sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* 2169, sous forme purifiée.
8. Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*, un

fragment ou un analogue de ladite sous-unité ; en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur.

9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 8, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis*.
10. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'au moins une souche de *N. meningitidis* sérogroupe B.
11. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ.
12. Une composition pharmaceutique selon la revendication 11, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2394.
13. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une souche de *N. meningitidis* ; ladite sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ.
14. Une composition pharmaceutique selon la revendication 13, qui comprend à titre d'agent thérapeutique la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2169.
15. Une composition pharmaceutique selon la revendication 9, qui comprend à titre d'agent thérapeutique :
  - i) une première sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une première souche de *N.*

*meningitidis* ; ladite première sous-unité ayant un poids moléculaire de 65 à 74 kD environ ; et

- ii) une seconde sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine d'une seconde souche de *N. meningitidis* ; ladite seconde sous-unité ayant un poids moléculaire de 75 à 90 kD environ ;

en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur desdites première et deuxième souches de *N. meningitidis*.

16. Une composition pharmaceutique selon la revendication 15, qui comprend à titre d'agent thérapeutique :

- i) la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2394 ; et
- ii) la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de *N. meningitidis* 2169 ;

en l'absence de la sous-unité de haut poids moléculaire dudit récepteur des souches de *N. meningitidis* 2394 et 2169.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR92/00904

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl.: 5 C07K13/00 A61K39/095

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.: 5 C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 1 November 1990 cited in the application see the whole document  -----	1-6,8-13
X,P	WO,A,9 203 467 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 5 March 1992 see page 8, line 10 - page 10, line 35 see page 21, line 5 - page 23, line 13 see page 37, line 1 - line 26  -----	1-3,6,8-10,13
X	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 58, No. 9, September 1990, WASHINGTON US pages 2875 - 2881 NIRUPAMA BANERJEE-BHATNAGAR ET AL  ..../....	1-4,6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

1 15 January 1993 (15.01.93)

08 February 1993 (08.02.93)

Name and mailing address of the ISA/  
EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00904

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>"Expression of neisseria meningitidis Iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential use as vaccines"        see the whole document</p> <p>-----</p>	
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY        Vol. 56, No. 5 May 1988, WASHINGTON US        pages 1144 - 1149        SCHRYVERS A. ET AL "Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from neisseria meningitidis"        see the whole document</p> <p>-----</p>	1-6
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 111, No. 17, 23 October 1989,        Columbus, Ohio, US;        abstract No. 150244,        SCHRYVERS A. ET AL "identification and characterization of the transferrin receptor from neisseria meningitidis" page 389 ; column 2 ;        see abstract        &amp; Mol.Microbiol. 1988 2(2),281-288</p> <p>-----</p>	1-6

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9200904  
SA 66294

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A-	5526190	16-11-90
		US-A-	5141743	25-08-92
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9203467	05-03-92	AU-A-	8747791	17-03-92
-----	-----	-----	-----	-----

*This Page Blank (uspto)*

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 92/00904

Demande Internationale No

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  
 CIB 5\_C07K13/00; A61K39/095

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>9</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL) 1 Novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ----	1-6,8-13
X,P	WO,A,9 203 467 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 5 Mars 1992 voir page 8, ligne 10 - page 10, ligne 35 voir page 21, ligne 5 - page 23, ligne 13 voir page 37, ligne 1 - ligne 26 ----	1-3,6, 8-10,13 --/-

### ° Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  
 15 JANVIER 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  
 08.02.

Administration chargée de la recherche internationale  
 OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé  
 FERNANDEZ Y BRA F.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °		No. des revendications visées <sup>18</sup>
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY vol. 58, no. 9, Septembre 1990, WASHINGTON US pages 2875 - 2881 NIRUPAMA BANERJEE-BHATNAGAR ET AL 'Expression of neisseria meningitidis Iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential use as vaccines' voir le document en entier ----</p>	1-4,6
X	<p>INFECTION AND IMMUNITY vol. 56, no. 5, Mai 1988, WASHINGTON US pages 1144 - 1149 SCHRYVERS A. ET AL 'Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from neisseria meningitidis' voir le document en entier ----</p>	1-6
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 111, no. 17, 23 Octobre 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 150244, SCHRYVERS A. ET AL 'Identification and characterization of the transferrin receptor from Neisseria meningitidis' page 389 ; colonne 2 ; voir abrégé &amp; Mol.Microbiol. 1988 2(2),281-288 -----</p>	1-6

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200904  
SA 66294

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont extraits du fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A- 5526190 US-A- 5141743	16-11-90 25-08-92
WO-A-9203467	05-03-92	AU-A- 8747791	17-03-92

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)